

シロイヌナズナにおけるRubisco-containingbody/ オートファジーによる葉緑体タンパク質の分解機構 と栄養素リサイクルにおける役割の解析

著者	泉 正範
号	48
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1038号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60220

いずみ まさのり

氏 名（本 籍 地） 泉 正 範

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1038 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 24 年 3 月 27 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論 文 題 目 シロイヌナズナにおける Rubisco-containingbody/オートファジーによる葉緑
体タンパク質の分解機構と栄養素リサイクルにおける役割の解析

博士論文審査委員 （主査）准教授 石 田 宏 幸

教 授 牧 野 周

准教授 早 川 俊 彦

准教授 新 谷 尚 弘

論文内容要旨

序論

C₃植物では葉の全窒素の約 75%が葉緑体に分配されており、特に光合成の CO₂ 固定酵素 Rubisco には 27%と最も多くが投資されている。これら葉緑体タンパク質の多くは葉の老化期に分解され、派生した窒素は成長部位へ転流・再利用され、最終的には子実に蓄えられ次世代へと引き継がれる。またタンパク質分解により生じるアミノ酸は呼吸基質、つまり炭素源としても再利用される。このような植物の栄養素リサイクルにおいて葉緑体タンパク質は最大の分解基質である。一方 Rubisco は現大気条件下で光合成の律速段階となるため、その分解は必然的に光合成機能の低下につながり、農学的見地からはマイナス要因となる局面がある。以上のように葉緑体成分の分解は、栄養利用と光合成機能の両面から植物の成長に強く関わる重要な機構である。

著者が所属する植物栄養生理学分野の先行研究において、Chiba et al. (2003) はコムギ老化葉の免疫電子顕微鏡観察を行い、Rubisco が葉緑体ストロマに加え、主に細胞質や稀に液胞内に存在する直径 0.4-1.2 μm の小胞にも局在していることを発見し、その小胞を Rubisco-containing body (RCB) と名付けた。さらに詳細な形態観察から、RCB の周縁に autophagosome に似た二重膜構造が見られることを見出し、オートファジー様の機構により Rubisco が RCB を介して液胞に輸送・分解される RCB 経路の存在を示唆した。オートファジーとは真核生物に高度に保存される細胞内のバルクなタンパク質分解系である。主に酵母の研究成果から構築されたマクロオートファジーのモデルでは、オルガネラを含む細胞質成分が二重膜小胞 autophagosome により隔離され、液胞へ輸送後に外膜が液胞膜と融合、autophagic body と呼ばれる内膜構造が液胞内に放出され分解される。オートファジーは様々な生理機能に関わるが、元来出芽酵母の栄養飢餓時に誘導されるタンパク質分解系として見出された機構であり、植物においても主に窒素や炭素の欠乏時に誘導されタンパク質のリサイクルを担っていると考えられている (Bassham et al., 2006)。しかし最大のリサイクル源となる葉緑体成分の分解についてオートファジーの関与は明確にされておらず、オートファジーが植物の栄養利用にどのように寄与するか、その実態は明らかでなかった。

本研究ではモデル植物シロイヌナズナを用い、まず RCB 経路の存在を実証した。そのうえで RCB 形成の栄養環境に対する応答とその生理的意義について解析することで、植物の栄養素リサイクルにおける RCB/オートファジーの役割を明らかにしていくことを目的とした。

第1章 シロイヌナズナ生細胞における RCB の可視化

本章では RCB 経路の存在を実証するため、GFP でラベルした Rubisco を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作出し、*in vivo* で RCB を可視化した。同様の解析をオートファジーに必須の遺伝子 *ATG5* 遺伝子欠損体 (*atg5-1*) においても行った。

(1) RBCS-GFP を発現するシロイヌナズナ形質転換体の作出

Rubisco の小サブユニット (RBCS) をコードする遺伝子 *RBCS2B* と GFP の融合タンパク質を *RBCS2B* 自身のプロモーター制御下で発現するコンストラクトを作成した (Fig. 1A)。その形質転換体の葉から抽出した可溶性タンパク質を RBCS 抗体、GFP 抗体を用いた SDS-PAGE/immuno-blot により解析し、RBCS-GFP の発現を確認した (Fig. 1B)。さらに Non denaturing-PAGE により、GFP 蛍光を有し、かつ RbcL 抗体、RBCS 抗体の両方で検出される Rubisco ホロ酵素の存在を確認し、発現した RBCS-GFP が Rubisco-GFP として存在していることを示した (Fig. 1C)。

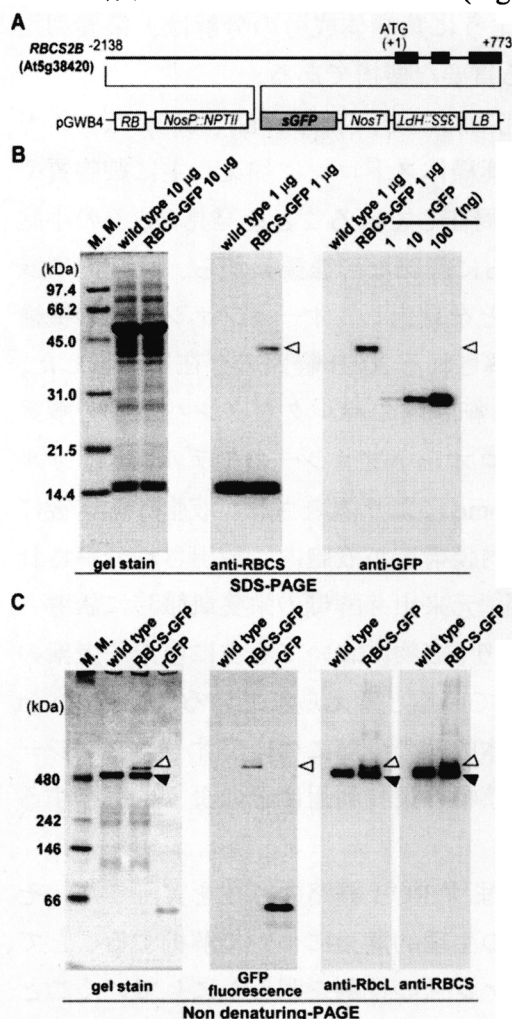


Figure 1. Transgenic Arabidopsis expressing GFP-labeled Rubisco by the *RBCS* promoter. **A**, Organization of the *RBCS2B*-GFP fusion construct. Black bars represent exons. Numbers indicate nucleotide positions from the translation initiation codon (ATG). HPT, Hygromycin phosphotransferase; LB, left border; NosP and NosT, promoter and terminator sequences of nopaline synthase; NPTII, neomycin phosphotransferase; RB, right border; sGFP, synthetic GFP with the S65T mutation; 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter. **B**, SDS-PAGE analysis of the *RBCS2B*-GFP fusion. Total soluble proteins (10 µg for gel stain, 1 µg for immunoblotting) extracted from fresh leaves expressing the *RBCS2B*-GFP fusion (RBCS-GFP) and from fresh leaves of wild-type Columbia (wild type) as a control and a dilution series of a known amount of recombinant GFP (rGFP) were separated by SDS-PAGE and either stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (gel stain) or analyzed by immunoblotting with anti-RBCS or anti-GFP antibodies. White arrowheads indicate the mature form of *RBCS2B*-GFP after cleavage of the *RBCS2B* transit peptide. **C**, Non denaturing-PAGE analysis of the *RBCS2B*-GFP fusion. Total soluble proteins (10 µg for gel stain and GFP fluorescence, 1 µg for immunoblotting) extracted from fresh leaves expressing the *RBCS2B*-GFP fusion (RBCS-GFP) and from fresh leaves of wild-type Columbia (wild type) as a control and 0.5 µg of recombinant GFP (rGFP) were separated by non denaturing-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (gel stain), analyzed by an image analyzer (LAS-3000) to detect GFP fluorescence, or analyzed by immunoblotting with anti-RbcL or anti-RBCS antibody. Black arrowheads indicate native Rubisco holoenzyme, and white arrowheads indicate GFP-labeled Rubisco holoenzyme. The sizes of molecular mass markers (M. M.; kilodaltons) are indicated at left of the stained gels (B and C).

(2) RCB の可視化

Rubisco-GFP の蛍光は葉肉細胞において葉緑体上に検出された (Fig. 2A)。液胞の分解活性を低下させ液胞内に輸送される RCB を可視化するため、RBCS-GFP 発現体の成熟葉を切離し、液胞 ATPase の阻害剤である concanamycin A 存在下、暗所で 20 時間インキュベートした。その結果、Rubisco-GFP の蛍光を有する多数の小胞が細胞中心部に蓄積し、RCB の検出に成功した (Fig. 2B)。同様の操作を *atg5-1* で行くと、RCB は全く検出されず (Fig. 2C)、RCB 経路がオートファジーにより進行していることが示された。

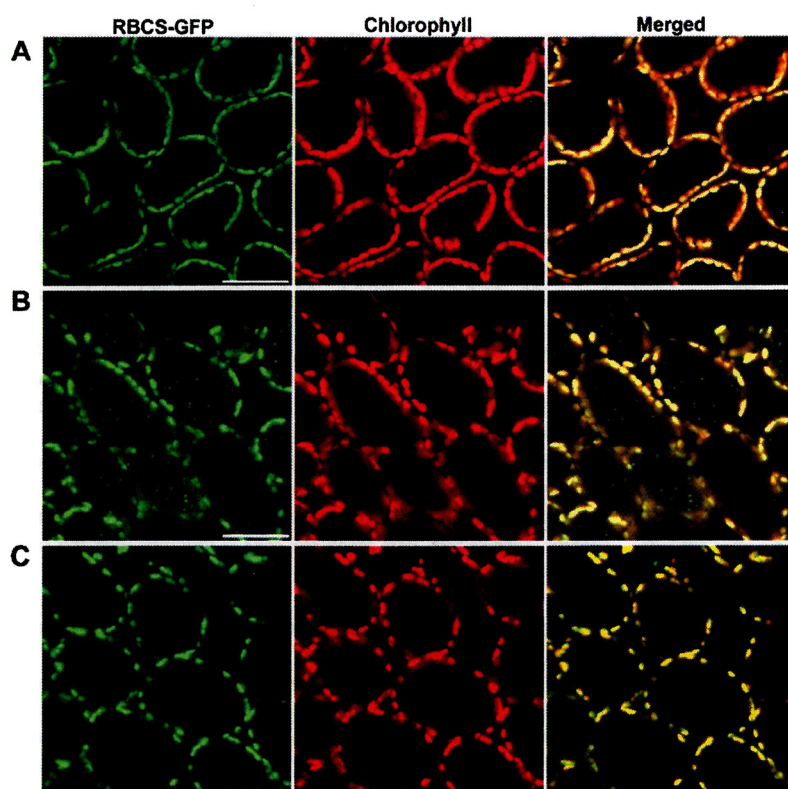


Figure 2. Visualization of Rubisco-containing bodies by GFP-labeled Rubisco. A, A fresh leaf excised from an RBCS2B-GFP transgenic plant (wild-type background) was observed immediately. B and C, Excised leaves from the RBCS2B-GFP transgenic plants of wild-type background (B) or *atg5-1* background (C) were incubated in 10 mM MES-NaOH (pH 5.5) with the addition of 1 μ M concanamycin A at 23°C for 20 h in darkness. GFP appears green, and chlorophyll fluorescence appears red. In merged images, the overlap of GFP and chlorophyll fluorescence appears yellow. Bars = 50 μ m.

以上の結果に加え、葉緑体ストロマに移行する蛍光タンパク質 (GFP、DsRed) によっても RCB は可視化され、autophagosome のマーカーである GFP-ATG8 とストロマ移行 DsRed は液胞内の autophagic body 上に共局在することが示された (Ishida et al., 2008)。よって Rubisco を含む葉緑体ストロマ成分が RCB として切り離され ATG 遺伝子に依存したオートファジー機構により液胞に輸送・分解されることが明らかとなった。

第2章 葉の栄養環境が RCB および autophagosome の形成に及ぼす影響

本章では、異なる栄養環境下にあるシロイヌナズナの葉において RCB および autophagosome 形成を解析することでその栄養環境との関係を明らかにすることとした。

(1) 切離葉におけるインキュベート時の栄養環境が RCB 形成に及ぼす影響

ストロマ移行 GFP 発現体の老化初期の葉を切離し concanamycin A 存在下、暗所でインキュベートすると多量の RCB が蓄積する。この条件下で MS 培地成分や糖の添加、および光照射の RCB 形成への影響を解析した (Fig. 3)。その結果 RCB 形成は Suc、Glc、Fru の代謝糖のみの添加および光照射によって強く抑制された。光による抑制は光合成電子伝達の阻害剤である DCMU の添加によって軽減されたことから、ここにも光合成による糖生産が関与することが示された。同様の解析を、RCB と autophagic body を同時に可視化できるストロマ移行 DsRed と GFP-ATG8 の共発現体の葉において行った (Fig. 4)。その結果、葉緑体以外の成分を含む autophagic body (non-RCB-type autophagic

body) の蓄積は、光照射時には全く抑制されず、一方窒素成分の存在によってある程度抑制され、RCB 形成とは異なる応答を示した。このことはオートファジー機構における RCB 特異的な制御機構の存在を示唆している。

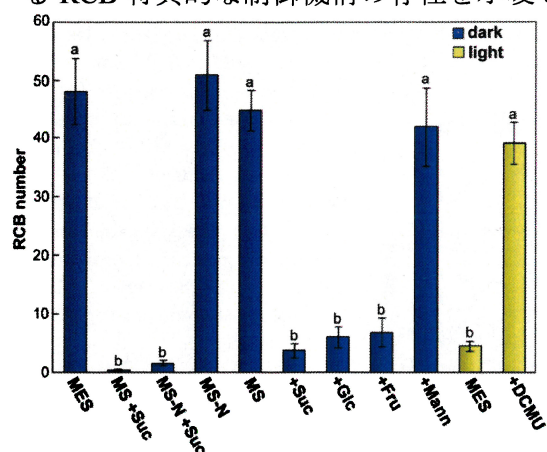


Figure 3. Effects of incubation conditions on the appearance of Rubisco-containing bodies. Fourth leaves of stroma-targeted GFP expressing plants at 30 d after sowing (5 d after bolting) were excised and incubated in 10 mM MES-NaOH (pH 5.5) with 1 μ M concanamycin A and 100 μ M E-64d at 23°C for 20 h in darkness (blue columns) or light (yellow columns) and with various constituents (MES, no constituent; MS, MS medium; MS-N, nitrogen-free MS medium; +Suc, 3% (w/v) Suc; +Glc, 3% (w/v) Glc; +Fru, 3% (w/v) Fru; +Mann, 3% (w/v) mannitol; +DCMU, 10 μ M DCMU). Leaves from four independent plants were incubated and eight quadrangular regions (188 μ m \times 188 μ m each) per leaf were monitored by LSCM, and the number of accumulated RCBs was counted (RCB number). Each image was considered as an independent data point and subjected to statistical analysis, Tukey's test. Bars mean \pm SE ($n=32$). Columns with the same letter were not significantly different ($P \leq 0.01$).

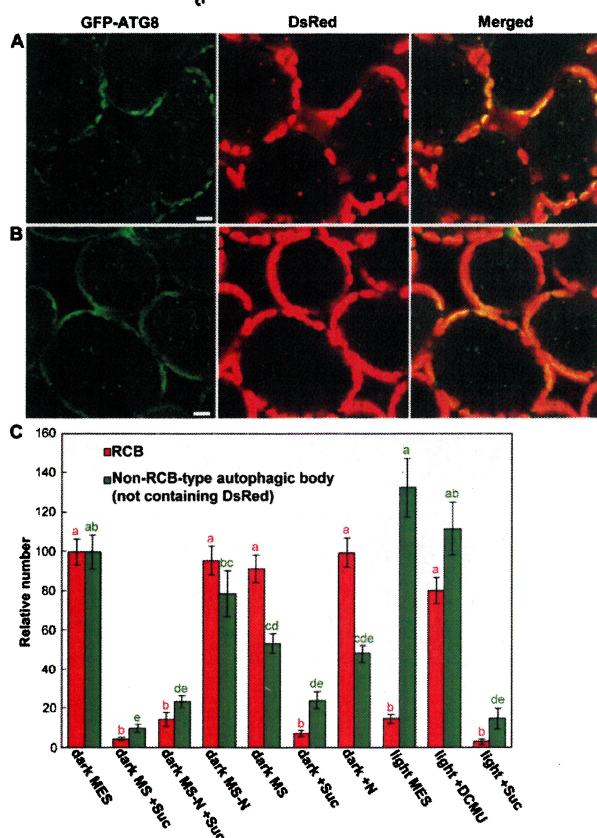


Figure 4. Effects of incubation conditions on the appearance of RCBs and autophagic bodies. A and B, Visualization both of RCBs and autophagic bodies. Excised leaves from both GFP-ATG8 and stroma-targeted DsRed expressing plants at 25 d after sowing (5 d after bolting) were incubated at 23°C for 20 h in 10 mM MES-NaOH (pH 5.5) with 1 μ M concanamycin A and 100 μ M E-64d in darkness (A) or in the light (B). GFP appears green and DsRed appears red. In merged images, overlap of GFP and DsRed appears yellow. Bars = 50 μ m. C, The appearance of RCBs and non-RCB-type autophagic bodies in various incubation conditions. Excised leaves from GFP-ATG8 and stroma-targeted DsRed expressing plants were incubated as described in A and B in darkness (dark) or light (light) with various constituents described in Figure 3 (except for +N, nitrogen nutrition of MS medium). Leaves from six independent plants were incubated and eight quadrangular regions (188 μ m \times 188 μ m each) per leaf were monitored by LSCM, and the number of accumulated RCBs (red columns) and non-RCB-type autophagic bodies not containing DsRed (green columns) was counted respectively. The each number is shown as percent of the level in "dark MES". Each image was considered as an independent data point and subjected to statistical analysis, Tukey's test. Bars mean \pm SE ($n=48$). Columns with the same letter were not significantly different in RCBs (red letters) and in non-RCB-type autophagic bodies (green letters) respectively ($P \leq 0.05$).

(2) 葉の炭水化物量が RCB 形成に及ぼす影響

葉内の炭水化物量が RCB 形成に及ぼす影響を解析した。葉の炭水化物量は日周変動するため、暗期終了時、暗期延長時、明期終了時の各段階で葉を切離し、その後暗所で 10 時間、concanamycin A 処理した際の RCB 形成を調べた (Fig. 5A)。デンプン含量が少ない暗期終了時、暗期延長時の葉では多量の RCB が検出され、一方デンプンが蓄積した明期終了時の葉では RCB 形成が有意に低下した (Fig. 5B)。そこで次にデンプンが蓄

積しない starchless 変異体 (*pgm-1*, *adg1-1*)、過剰蓄積する starch-excess 変異体 (*sex1-1*, *mex1-1*) を、これら変異体が野生体と同様に生育する条件である連続光下で栽培し (Fig. 6)、RCB 形成を比較した (Fig. 7)。RCB 形成は野生体に対し starchless 変異体で有意に高く、starch-excess 変異体では抑制された。

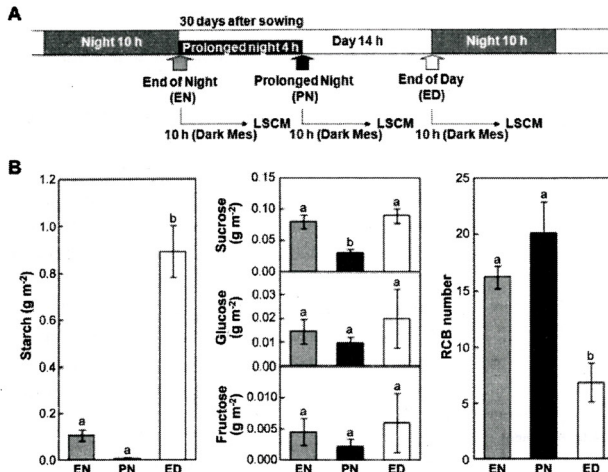


Figure 5. Effects of timing of leaf excision in a diurnal cycle on the appearance of RCBs. A, Schematic representation of this experiment. Fourth leaves of stroma-targeted GFP expressing plants at 30 d after sowing were excised at the end of the regular night cycle (EN) or after 4 h prolonged night (PN) or the end of the day (ED) in a day cycle. B, The leaf carbohydrates contents and the appearance of RCBs. The contents of starch (left) and Suc, Glc, Fru (center) in leaves were determined. Excised leaves at each point were incubated at 23°C for 10 h in 10 mM MES-NaOH (pH 5.5) with 1 μ M concanamycin A and 100 μ M E-64d in darkness. Leaves from four independent plants were incubated and eight quadrangular regions (188 μ m \times 188 μ m each) per leaf were monitored by LSCM, and the number of accumulated RCBs was counted (right). Bars mean \pm SE [$n=3-4$ (carbohydrates contents) or 32 (RCB number)]. Statistical analysis was performed by Tukey's test. Columns with the same letter were not significantly different ($P \leq 0.05$).

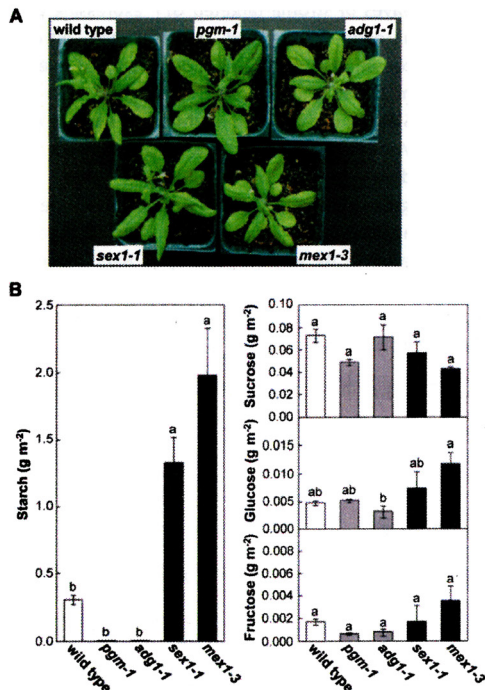


Figure 6. The leaf carbohydrates contents in starch-related mutants under continuous illumination. A, Transgenic plants expressing stroma-targeted GFP of background wild-type, starchless mutants (*pgm-1*, *adg1-1*) and starch-excess mutants (*sex1-1*, *mex1-3*) were grown for 26 d after sowing (5 d after bolting) in continuous illumination (60 μ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$). B, The contents of starch (left) and Suc, Glc, Fru (right) were determined in wild-type and each mutant leaves. Bars mean \pm SE ($n=3$). Statistical analysis was performed by Tukey's test. Columns with the same letter were not significantly different ($P \leq 0.05$).

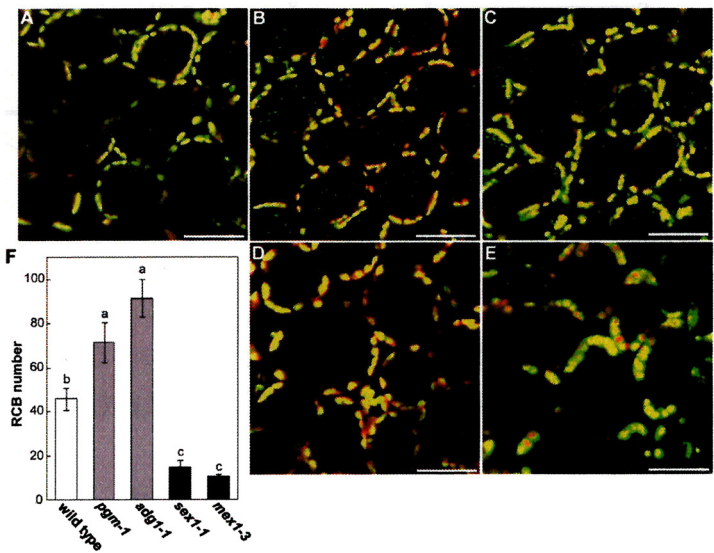


Figure 7. Effects of mutations affecting leaf starch content on the appearance of RCBs. A-E, Visualization of RCBs in leaves of starch-related mutants. Transgenic plants expressing stroma-targeted GFP of background wild-type (A), *pgm-1* (B), *adg1-1* (C), *sex1-1* (D) or *mex1-3* (E) were incubated at 23°C for 20 h in 10 mM MES-NaOH (pH 5.5) with 1 μ M concanamycin A and 100 μ M E-64d in darkness and observed with LSCM. GFP appears green and chlorophyll fluorescence appears red. Merged images are shown. Bars = 50 μ m. Leaves excised from five independent plants of wild-types and each mutant were incubated and eight quadrangular regions (188 μ m \times 188 μ m each) per leaf were monitored by LSCM, and the number of accumulated RCBs was counted (F). Bars mean \pm SE ($n=40$). Statistical analysis was performed by Tukey's test. Columns with the same letter were not significantly different ($P \leq 0.05$).

(3) 窒素欠乏条件下における RCB 形成

植物体を水耕栽培し、抽臺開始時から窒素欠乏処理をかけ葉における RCB 形成の変化を調べた。窒素欠乏の植物体の葉においてはクロロフィル、窒素、可溶性タンパク質、Rubisco の減少が促進された (Fig. 8)。しかし炭水化物、特にデンプン、Glc、Fru の著しい蓄積とともに RCB 形成は抑制された (Fig.9)。

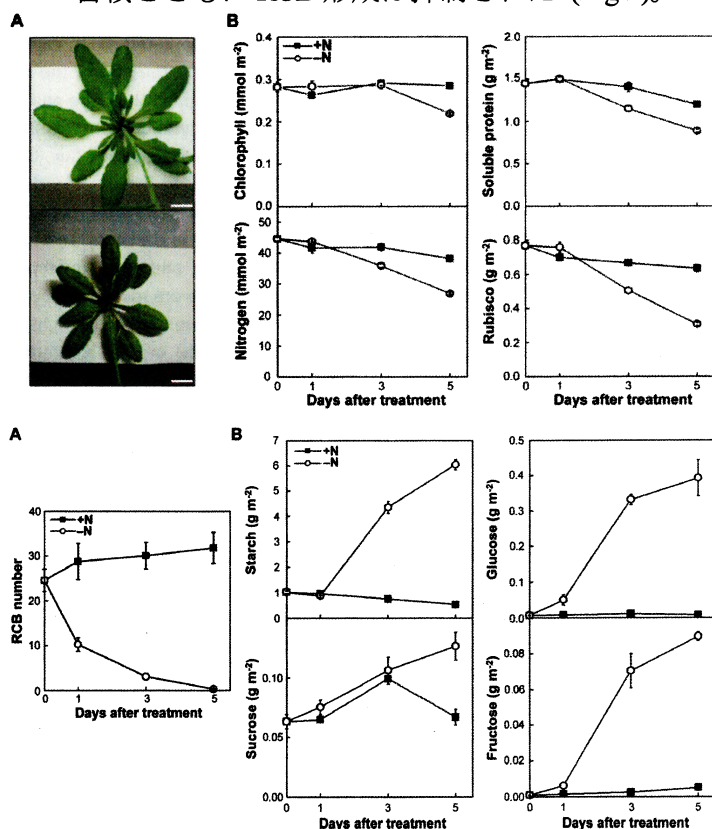


Figure 8. Nitrogen-limited senescence. A, Photographs of plants under nitrogen-rich conditions as a control (upper image) or nitrogen-limited conditions (under image) at 5 d after treatment. Stroma-targeted GFP expressing plants were hydroponically grown with nitrogen-rich solution. When plants were started bolting (23 d after sowing), hydroponic solution was replaced to the same nitrogen-rich solution as a control and nitrogen-free solution, and plants were grown more 5 d. Bars=10 mm. B, Changes in the chlorophyll, nitrogen, soluble protein and Rubisco protein contents in leaves of plants under nitrogen-rich (closed squares) and nitrogen-limited conditions (open circles) over the treatment period. Bars mean \pm SE ($n=3$).

Figure 9. The effects of the nitrogen-limitation on the appearance of RCBs and leaf carbohydrates contents. Fourth leaves of stroma-targeted GFP expressing plants under nitrogen-rich (closed squares) and nitrogen-limited conditions (open circles) were excised over the treatment period and incubated at 23°C for 20 h in 10 mM MES-NaOH (pH 5.5) with 1 μ M concanamycin A and 100 μ M E-64d in darkness. Leaves from four independent plants were incubated and eight quadrangular regions (188 μ m \times 188 μ m each) per leaf were monitored by LSM, and the number of accumulated RCBs was counted (A). Bars mean \pm SE ($n=32$). The changes in the starch, Suc, Glc, and Fru contents were measured over the treatment period (B). Bars mean \pm SE ($n=3$).

以上の結果から、オートファジーによる RCB を介した葉緑体成分の分解は、窒素栄養ではなく葉の炭素栄養環境と密接に結びついていることが示された。

第3章 炭素制限環境における RCB/オートファジーの重要性

本章では第2章の結果を発展させ、夜間の炭素源であるデンプンが蓄積しないために炭素欠乏が起きる *starchless* 変異体と、オートファジー欠損変異体との二重変異体を作出、解析することで炭素制限環境における RCB/オートファジー系の重要性を検証した。

(1) *starchless* オートファジー二重変異体の表現型

pgm-1、*adgl-1*、*sex1-1* について *atg5-1* との二重変異体を作出した。各変異体を短日、長日および連続光条件下で栽培したところ、短日条件下でのみ *pgm-1 atg5-1*、*adgl-1 atg5-1* 二重変異体の葉が栄養成長期の間に枯死した (Fig. 10A-C)。地上部新鮮重を比較すると、*ATG5* 欠損による生育への影響は連続光条件では見られなかったが、長日および短日条件では生育遅延が見られた (Fig. 10D-F)。最も顕著な表現型が見られた短日

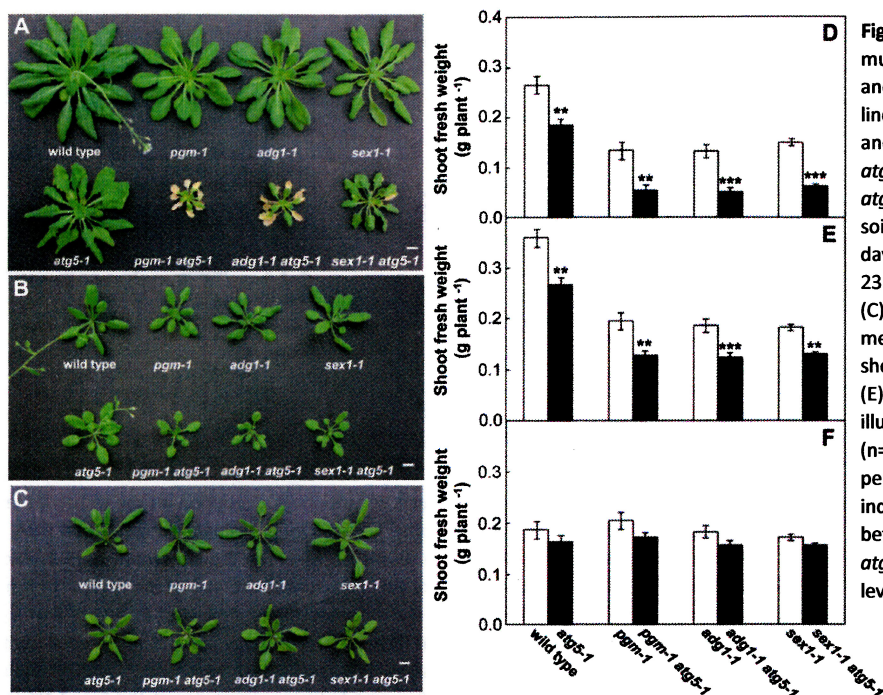


Figure 10. Phenotypes of double mutants both of starch-related genes and *ATG5*. Wild-type, single mutant lines (*atg5-1*, *pgm-1*, *adg1-1*, *sex1-1*) and double mutant lines (*pgm-1 atg5-1*, *adg1-1 atg5-1*, *sex1-1 atg5-1*) were grown on nutrient-rich soil for 60 d after sowing under short day (A), 30 d under long day (B) and 23 d under continuous illumination (C). D-F, Shoot fresh weight were measured at 40 d after sowing under short day (D), 30 d under long day (E) and 23 d under continuous illumination (F). Bars mean \pm SE (n=4-5). Statistical analysis was performed by t-test; ** and *** indicate significant differences between presence and absence of *atg5* mutation at the 1 and 0.1% levels respectively.

条件において夜間の炭水化物量の変動を測定した (Fig. 11)。野生体、*atg5-1* に対し *starchless* の変異が入った *pgm-1*、*adg1-1*、*pgm-1 atg5-1*、*adg1-1 atg5-1* ではデンプンが蓄積せず、代わりに蓄積した可溶性糖の大半が夜間前半に消費され、後半には炭素が不足していることが確認された。そこで夜間終了時の葉において、炭素欠乏に応答して発現する *dark-inducible gene (DIN)* として *DIN6*、*DIN1*、*ATL8* の発現解析を行った (Fig. 12)。各遺伝子の発現は野生体に比べ、*pgm-1*、*adg1-1* で著しく上昇しており、炭素欠乏が起きていることが確認された。加えて *DIN6*、*ATL8* の発現は *pgm-1 atg5-1*、*adg1-1 atg5-1* でさらに有意に上昇しており、オートファジー欠損により炭素欠乏がより強く起きることが示唆された。この点をさらに検証するため、通常の明暗周期から暗期を 2 h、4 h、6 h と延長した際の、各 *DIN* 遺伝子の発現を野生体と *atg5-1* とで比較した (Fig. 13)。この条件においても、各 *DIN* 遺伝子の発現は野生体に対し *atg5-1* でより早く誘導される傾向が見られた。

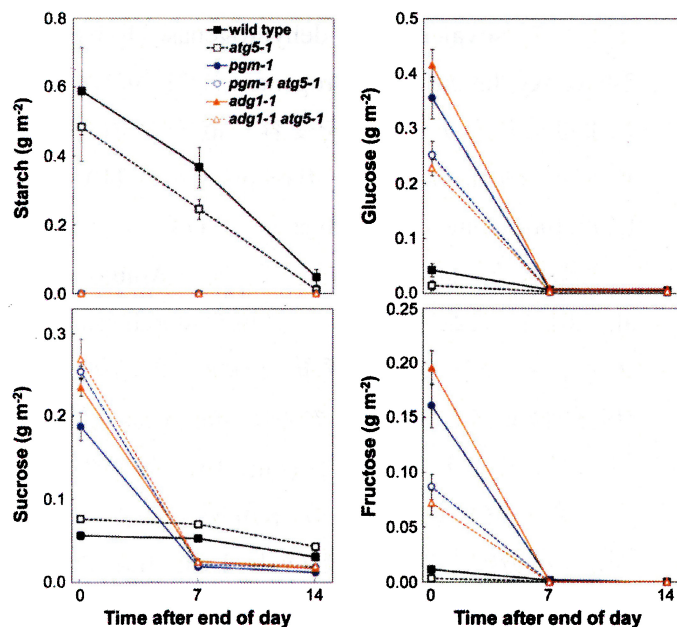


Figure 11. Carbohydrates availability during the 14 h night period in leaves of double mutants both of starchless and *ATG5*. The changes of starch, Suc, Glc and Fru contents were measured in leaves of wild-type, single mutant lines (*atg5-1*, *pgm-1*, *adg1-1*) and double mutant lines (*pgm-1 atg5-1*, *adg1-1 atg5-1*) 0 h, 7 h and 14 h after the end of the day during 14 h night period. Bars mean \pm SE (n=4).

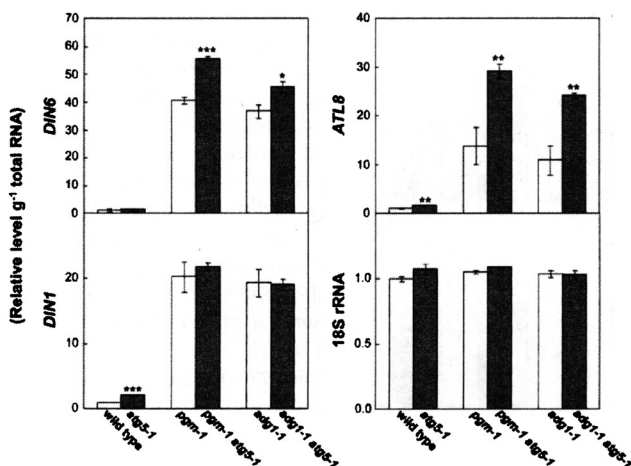


Figure 12. Transcript levels of dark-inducible genes in leaves at the end of the night under short day conditions. Total RNA was isolated from leaves of wild-type, single mutant lines (*atg5-1*, *pgm-1*, *adg1-1*) and double mutant lines (*pgm-1 atg5-1*, *adg1-1 atg5-1*) at the end of the night of 40 d after sowing, and subjected to qRT-PCR analysis. 18S ribosomal RNA (18S rRNA) was used as an internal control. Bars mean \pm SE ($n=4$). Statistical analysis was performed by t-test; *, ** and *** indicate significant differences between presence and absence of *atg5* mutation at the 5, 1, 0.1% levels respectively.

(2) 炭素欠乏時の代替呼吸基質供給系としてのオートファジー

近年の研究により、炭素欠乏時にアミノ酸のミトコンドリア呼吸鎖への供給に関わる因子として isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVDH), 2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D2HGDH)、およびこれらから電子を受容し電子伝達に供給する electron-transfer flavoprotein (ETF)、ETF:ubiquinone oxidoreductase (ETFQO) といった遺伝子が同定されてきている (Araújo et al., 2011)。これらの遺伝子発現を *starchless*、オートファジー変異体系統で解析した結果、*IVDH* および *ETFQO* の発現が *starchless* 変異体で著しく上昇していた (Fig. 14)。植物のアミノ酸分解代謝は多くが未解明であるが、*IVDH* は分岐鎖アミノ酸 (Val、Leu、Ile) および芳香族アミノ酸 (Phe、Trp、Tyr) の分解代謝に関与すると考えられている。炭素制限環境下での、オートファジー欠損によるアミノ酸プールへの影響を調べるため、*pgm-1* と *pgm-1 atg5-1* とで代謝物比較を行った。全遊離アミノ酸含量に差は見られなかったが、分岐鎖アミノ酸の Val、Leu、Ile、芳香族ア

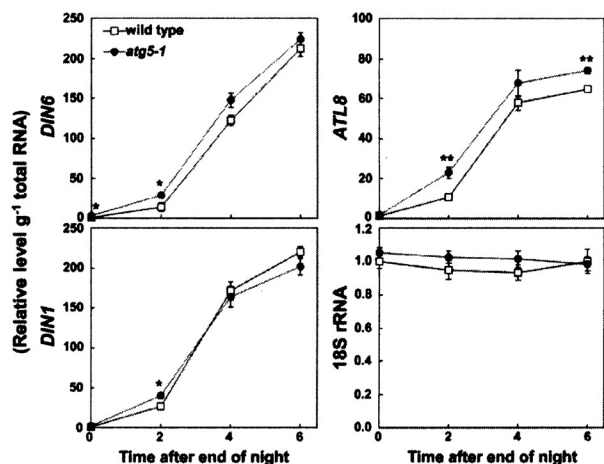


Figure 13. Effects of autophagy-disruption on the transcript levels of dark-inducible genes during prolonged night. Total RNA was isolated from leaves of wild-type (squares) and *atg5-1* (circles) plants 0 h, 2 h, 4 h and 6 h after the end of the regular 14 h-night period at 30 d after sowing, and subjected to qRT-PCR analysis. 18S ribosomal RNA (18S rRNA) was used as an internal control. Statistical analysis was performed by t-test; * and ** indicate significant differences between genotypes at the 5 and 1% levels respectively. Bars mean \pm SE ($n=4$).

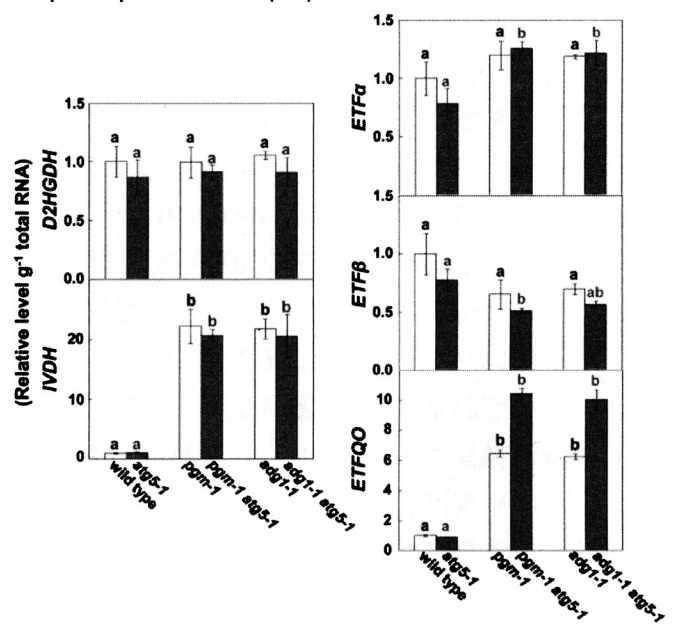


Figure 14. Transcript levels of genes involving branched-chain amino acids catabolism in leaves at the end of the night under short day conditions. Total RNA was isolated from leaves of wild-type, single mutant lines (*atg5-1*, *pgm-1*, *adg1-1*) and double mutant lines (*pgm-1 atg5-1*, *adg1-1 atg5-1*) at the end of the night of 40 d after sowing, and subjected to qRT-PCR analysis measuring transcript levels of *ETFα*, *ETFβ*, *ETFQO*, *D2HGDH* and *IVDH*. Statistical analysis was performed by Tukey's test. Columns with the same letter were not significantly different among wild-type, *pgm-1* and *adg1-1* (black letters; $P \leq 0.05$) or among *atg5-1*, *pgm-1 atg5-1* and *adg1-1 atg5-1* (gray letters; $P \leq 0.05$).

ミノ酸のうち Trp、Tyr、また Thr、His 含量が *pgm-1 atg5-1* で有意に低下していた (Fig. 15)。オートファジーによるタンパク質分解が、IVDH、ETF/ETFQO 複合体といったアミノ酸分解代謝へのアミノ酸供給系になっていることが考えられた。

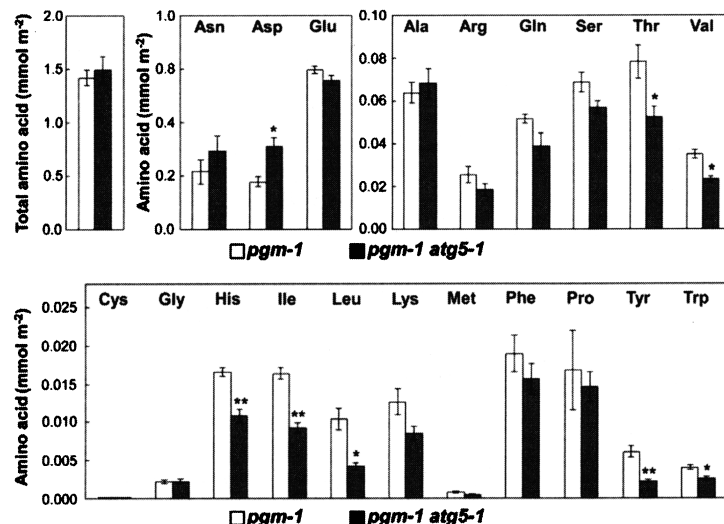


Figure 15. Leaf amino acids contents in double mutants both of *starchless* and *ATG5*. Amino acids contents were measure in leaves of *pgm-1* and *pgm-1 atg5-1* at the end of the night under short day conditions by CE-TOF/MS. Bars mean \pm SE ($n=3$). Statistical analysis was performed by t-test; * and ** indicate significant differences between genotypes at the 5 and 1% levels respectively.

要約

本研究ではシロイヌナズナにおいて、葉緑体に由来する小胞 RCB が植物の栄養利用機構において担う役割について研究を行い、以下のことを明らかにした。

1. GFP でラベルした Rubisco により *in vivo* で RCB を可視化した。葉緑体タンパク質が RCB を介したオートファジーにより液胞に輸送、分解されることの実証に貢献した。
2. 切離葉においては、RCB 形成は代謝糖のみの添加および光合成による糖生産によって抑制された。炭水化物量の日周変動、およびデンプン代謝変異体について、葉の炭水化物量と RCB 形成の関係を解析し、炭水化物、主にデンプンが蓄積した葉ほど RCB 形成が抑制されることを明らかにした。窒素欠乏条件下では、葉のタンパク質の減少は促進されるが、デンプン、Glc、Fru の顕著な蓄積とともに RCB 形成は抑制された。以上から、RCB による葉緑体成分の分解はオートファジー機構の中で窒素栄養ではなく葉の炭素栄養環境と密接に関わっていることが明らかとなった。また切離葉において、RCB 形成と他のオートファジーの栄養要因に対する応答は必ずしも一致しなかったことから、RCB 特異的な制御機構の存在が示唆された。
3. *Starchless* オートファジー二重変異体では、短日条件において生育遅延が起き、かつ生殖成長に至る前にほとんどの葉が枯死するという表現型が見られた。*Starchless* 変異体ではデンプンが蓄積しないため暗期に炭素欠乏が起きていた。*DIN* 遺伝子の発現解析から、オートファジーの欠損により炭素欠乏がより強く引き起こされることが示唆され

た。以上から、炭素制限環境における RCB/オートファジーの重要性が示された。また *starchless* オートファジー二重変異体では分岐鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸含量が低下しており、これらアミノ酸の分解代謝に関わる IVDH、ETF/ETFQO 複合体の ETFQO の遺伝子発現は *starchless* 変異体で顕著に上昇していた。RCB/オートファジーが、炭素制限時にこれらアミノ酸分解代謝へのアミノ酸供給系として機能していることが示唆された。

本研究は、葉緑体での光合成によるエネルギー生産が滞る炭素制限環境において、RCB を介したオートファジーにより葉緑体成分を分解することで、糖に代わる呼吸基質を供給しエネルギーを維持する、という植物の新たな栄養利用機構の存在を示唆するものである (Fig. 16)。

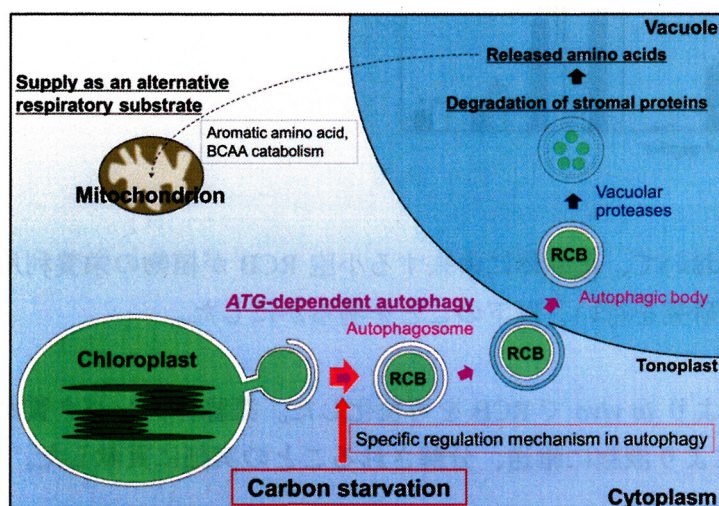


Figure 16. Proposed model of a role of RCB/autophagy degradation system under carbon-limitation. RCB production was promoted by carbon starvation possibly via specific regulation mechanism in autophagy. RCBs are transported to the vacuole and degraded by vacuolar proteases. Released amino acids, especially branched chain amino acids (BCAA) and aromatic amino acids, are catabolized and supplied to mitochondrial respiratory chain as an alternative respiratory substrate.

引用文献

- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR (2011) Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci* **16**: 489-499
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2-11
- Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* **44**: 914-921

博士論文の内容に関連する公表論文

Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T (2008) Mobilization of Rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an *ATG* gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol* **148**: 142-155

Izumi M, Wada S, Makino A, Ishida H (2010) The autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**: 1196-1209

Izumi M, Ishida H (2011) The changes of leaf carbohydrate contents as a regulator of autophagic degradation of chloroplasts via Rubisco-containing bodies during leaf senescence. *Plant Signal Behav* **6**: 685-687

Izumi M, Tsunoda H, Suzuki Y, Makino A, Ishida H (2012) *RBCS1A* and *RBCS3B*, two major members within the *Arabidopsis* *RBCS* multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity. *J Exp Bot* *in press*

Izumi M, Makino A, Ishida H The critical role of autophagy as a supply source of alternative respiratory substrates during carbon limitation in *Arabidopsis* leaves. *In preparation to be submitted*

その他の公表論文

Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A (2009) Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol* **149**: 885-893

論文審査結果要旨

光合成を行うオルガネラである葉緑体には、葉の全窒素の約 80% が分配されており、その大部分がタンパク質として存在する。特に CO₂ 固定酵素である Rubisco には全窒素の 30% 近くが分配されている。葉の老化期、また栄養欠乏や暗所など飢餓条件下ではこれら葉緑体タンパク質が盛んに分解され、栄養素やエネルギーがリサイクルされることで、細胞機能や個体成長の恒常性が維持されている。したがって Rubisco に代表される葉緑体タンパク質の分解は、植物の生産性を考える際、極めて重要となるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。先行研究では、Rubisco がコムギ老化葉では葉緑体ストロマに加えて細胞質や液胞に存在する直径 1 μ m 程度の小胞にも局在することが見いだされ、この小胞は Rubisco-containing body (RCB) と名付けられた。また、形態観察により RCB がオートファゴソームに似た 2 重膜構造体に囲まれていることから、RCB と細胞内タンパク質分解システム・オートファジーとの関連性が示唆された。

本研究は、RCB と Rubisco 分解との関係やその生理的役割について明らかにすることを目的に行われたものであり、その成果は次のように要約される。

1. GFP でラベルされた Rubisco を発現する形質転換体を作成し生細胞で RCB を可視化する系を構築した。RCB は葉緑体ストロマタンパク質をオートファジーにより特異的に液胞に輸送し分解する構造体であることを明らかにした。
2. RCB の形成は、葉の窒素栄養ではなく炭素栄養の状態と密接に関わっていることを明らかにした。特にデンプンが蓄積した葉ほど RCB 形成は抑制された。また RCB と他の細胞質成分のオートファジーの栄養要因に対する応答は必ずしも一致しないことから、RCB 特異的な制御機構の存在を示唆した。
3. Starchless、オートファジー二重変異体では、短日条件において生育が阻害された。これらの変異はいずれも夜間の炭素欠乏を助長した。また二重変異体では分岐鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸含量が低下し、これらアミノ酸の分解代謝に関わる遺伝子の発現が上昇した。よってオートファジーが、炭素制限時にこれらアミノ酸分解代謝へのアミノ酸供給系として機能することを示唆した。

以上、本研究は葉緑体での光合成によるエネルギー生産が滞った炭素欠乏時に、RCB を介したオートファジーにより葉緑体成分を分解することで、糖に代わる呼吸基質を供給しエネルギーを維持する、という植物の新たな栄養利用機構の存在を提唱するものである。研究成果は計 4 報の査読付き原著論文として国際誌に掲載されている。審査員一同は、本論文提出者に対し博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。